

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :  C12N 15/76		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/16046  (43) Date de publication internationale: 15 juin 1995 (15.06.95)																					
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/01413             (22) Date de dépôt international: 5 décembre 1994 (05.12.94)             (30) Données relatives à la priorité: 93/14701 8 décembre 1993 (08.12.93) FR</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et            (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): FRIEDMANN, Annick [FR/FR]; 2, route de Gif, F-91190 Villiers-le-Bâcle (FR). GUERINEAU, Michel [FR/FR]; 45, rue Saint-Placide, F-75006 Paris (FR). HAGEGE, Juliette [FR/FR]; 57, avenue Saint-Laurent, F-91400 Orsay (FR). PERNODET, Jean-Luc [FR/FR]; 21, rue des Jardins, F-94230 Cachan (FR). SEZONOV, Guennady [RU/FR]; 9, rue Varin, F-75006 Paris (FR).</p> <p>(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LT, LV, MD, MG, MN, MW, NZ, PL, RO, RU, SD, SE, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ).</p> <p><b>Publiée</b>  <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>  <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>																						
<p>(54) Title: REGULATORY NUCLEIC ACID SEQUENCES AND USES THEREOF             (54) Titre: SEQUENCES D'ACIDES NUCLEIQUES REGULATRICES ET UTILISATIONS             (57) Abstract             Novel nucleic acid sequences, vectors for expressing same, and uses of said sequences, in particular in Actinomycetes fermentation methods, are disclosed.             (57) Abrégé             La présente invention concerne de nouvelles séquences nucléiques, des vecteurs pour leur expression, et leur utilisation, notamment dans des procédés de fermentation chez les Actinomycetes.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>RBS PROMOTER promoteur RBS</th> <th>rmf GENE gène rmf</th> <th>OCCURRENCE OF FREE FORM pSAM2</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>pIJ487</td> <td>_____</td> <td>Apparition de la forme libre de pSAM2</td> </tr> <tr> <td>pOS541</td> <td>+1 +53 +563 ermE+ _____</td> <td>non NO</td> </tr> <tr> <td>pOS531</td> <td>_____</td> <td>oui YES pSAM2(B2)</td> </tr> <tr> <td>pOS532</td> <td>ermE+ _____</td> <td>non NO</td> </tr> <tr> <td>pOS544</td> <td>_____ BspHI (Klenow)</td> <td>non NO</td> </tr> <tr> <td>pOS666</td> <td>lipA _____</td> <td>oui YES pOS666</td> </tr> </tbody> </table>				RBS PROMOTER promoteur RBS	rmf GENE gène rmf	OCCURRENCE OF FREE FORM pSAM2	pIJ487	_____	Apparition de la forme libre de pSAM2	pOS541	+1 +53 +563 ermE+ _____	non NO	pOS531	_____	oui YES pSAM2(B2)	pOS532	ermE+ _____	non NO	pOS544	_____ BspHI (Klenow)	non NO	pOS666	lipA _____	oui YES pOS666
RBS PROMOTER promoteur RBS	rmf GENE gène rmf	OCCURRENCE OF FREE FORM pSAM2																						
pIJ487	_____	Apparition de la forme libre de pSAM2																						
pOS541	+1 +53 +563 ermE+ _____	non NO																						
pOS531	_____	oui YES pSAM2(B2)																						
pOS532	ermE+ _____	non NO																						
pOS544	_____ BspHI (Klenow)	non NO																						
pOS666	lipA _____	oui YES pOS666																						

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

## SEQUENCES D'ACIDES NUCLEIQUES REGULATRICES ET UTILISATIONS

La présente invention concerne une nouvelle séquence nucléique, des vecteurs pour son expression, et son utilisation dans des procédés de fermentation chez les Actinomycetes.

5 Les Actinomycetes sont des bactéries Gram (+) filamenteuses et ramifiées. Parmi les Actinomycetes, les Streptomyces représentent la famille la plus importante. Les Streptomyces sont des bactéries filamenteuses, sporulantes et vivant naturellement dans le sol dans des conditions de stricte aérobiose.

Les Actinomycetes, et notamment les Streptomyces, présentent un grand intérêt sur le plan industriel. En particulier, ils présentent la particularité de produire une grande variété de métabolites secondaires (Demain, Biology of Actinomycetes 88, Okami (Eds), Tokyo, Japan scientific societies press, 1988, p.19-25). Ces métabolites peuvent avoir des structures et des propriétés biologiques très différentes (herbicides, anticancéreux, antihelminthiques, anabolisants, antibiotiques, etc). Les plus connus de ces métabolites sont les antibiotiques (substances chimiques produites par un organisme et ayant un effet néfaste sur d'autres organismes). Les Streptomyces sont actuellement à l'origine de 70% des antibiotiques produits industriellement. La diversité structurale des antibiotiques synthétisés ne se retrouve dans aucun autre genre bactérien. Ainsi, presque tous les types de structure sont représentés : les β lactamines (ex. l'ampicilline), les antibiotiques polypeptidiques (ex. streptogramines), les antibiotiques aminoglycosidiques (ex. streptomycine, kanamycine, etc), les macrolides (ex. erythromycine, spiramycine, etc), ou encore les cyclines (ex. tétracycline), etc.

Pour ces raisons, il est particulièrement intéressant de pouvoir disposer d'outils (vecteurs, promoteurs, etc) permettant de manipuler génétiquement ces microorganismes. De tels outils permettraient en effet de modifier les niveaux de synthèse de ces métabolites, ou de préparer des intermédiaires de synthèse ou des dérivés de ces métabolites, etc. De tels outils permettraient également de faire fabriquer par ces microorganismes des produits recombinants, notamment des protéines hétérologues, selon les techniques du génie génétique.

A cet égard, la demande de brevet n° EP 350 341 décrit des vecteurs dérivés du plasmide pSAM2 ayant des propriétés très intéressantes. Ainsi, ces vecteurs sont

capables de s'intégrer de manière site-spécifique dans le génome des Actinomycetes, possèdent un large spectre d'hôte et une stabilité élevée. Par ailleurs, ils peuvent être utilisés pour le transfert et l'expression d'acides nucléiques dans les Actinomycetes. Toutefois, ces vecteurs présentent certains inconvénients qui résident notamment dans leur faible nombre de copies par cellules, et dans l'absence de moyens de contrôle du nombre de copies. Ainsi, pSAM2 et ses dérivés s'intègrent généralement à raison d'une seule copie par chromosome.

La présente invention apporte une solution à ce problème, en fournissant des outils capables d'améliorer les conditions d'utilisation industrielle de vecteurs dérivés de pSAM2. La présente invention décrit en effet un gène dont le produit d'expression conduit à l'apparition, à partir de formes intégrées, de formes libres réplicatives du plasmide pSAM2 ou de vecteurs dérivés de celui-ci. Ceci a pour effet d'augmenter le nombre de copies de pSAM2 ou de ses dérivés car les formes libres sont présentes à un nombre élevé de copies par cellule.

La présente invention décrit aussi des cassettes d'expression de ce gène, des vecteurs le contenant, et leur utilisation pour induire l'apparition de copies libres de pSAM2 ou de vecteurs intégratifs dérivés de celui-ci.

La demanderesse a en effet isolé, séquencé et caractérisé une région du plasmide pSAM2 capable d'induire l'apparition de copies libres réplicatives de pSAM2 ou de ses dérivés. La demanderesse a également montré que cette région pouvait être utilisée en cis (sur le même vecteur) ou en trans (pas sur le même vecteur) pour agir sur pSAM2 ou ses dérivés. La séquence de cette région est présentée sur la séquence SEQ ID n° 1. Plus précisément, cette région et son rôle fonctionnel ont été mis en évidence par l'étude de variants du plasmide pSAM2 : d'une part pSAM2(B2), provenant de *S.ambofaciens* ATCC 15154 pour lequel aucune forme libre n'est observée, d'autre part pSAM2(B3) et pSAM2(B4) provenant d'autres *S. ambofaciens*, pour lesquels la forme libre est observée avec la forme intégrée. Cette étude a permis de caractériser deux mutations ponctuelles différentes (celles de pSAM2(B3) et celle de pSAM2(B4)) localisées toutes deux dans la région promotrice contrôlant l'expression d'un gène de pSAM2 (Cf SEQ ID n° 1). Ces mutations conduisent à l'apparition de la forme libre de pSAM2(B3) et de pSAM2(B4). Ce gène a ensuite été cloné et séquencé, et sa capacité à provoquer l'apparition de la forme libre de plasmides dérivés de pSAM2 à partir de la copie intégrée a été démontrée.

Un premier objet de l'invention réside donc dans une séquence d'acide nucléique comprenant tout ou partie de la séquence SEQ ID n° 1 ou d'un variant de celle-ci.

Au sens de la présente invention, le terme variant désigne toute séquence 5 différentant de la séquence SEQ ID n°1 en raison de la dégénérescence du code génétique, ainsi que toute séquence hybrideant avec ces séquences ou des fragments de celles-ci et dont le produit possède l'activité indiquée. Ces variants peuvent être obtenus par toute technique connue de l'homme du métier, à partir de SEQ ID n° 1, notamment, mutation, délétion, substitution, addition, hybridation, etc. Les 10 hybridations peuvent être réalisées dans des conditions de stringence conventionnelles (Maniatis et al., Cf techniques générales de biologie moléculaire), ou, de préférence, dans des conditions de stringence élevées. La capacité des variants d'induire l'apparition de formes libres réplicatives de pSAM2 ou de ses dérivés peut être déterminée sur une souche d'Actinomycète contenant un tel plasmide intégré (par 15 exemple sur la souche ATCC 15154), en transfectant ledit variant dans la souche, dans des conditions permettant son expression, et en vérifiant l'apparition de formes libres (Cf exemples).

Un autre objet de l'invention concerne toute cassette d'expression de la séquence SEQ ID n° 1 ou d'un variant de celle-ci tel que défini ci-dessus, comprenant 20 ladite séquence ou variant sous contrôle d'un promoteur constitutif ou régulé.

L'utilisation d'un promoteur constitutif est particulièrement avantageuse lorsque la cassette est utilisée en trans pour induire des formes libres d'un plasmide intégré. Dans ce cas, les cellules contenant la forme intégrée du plasmide sont transfectées avec la cassette d'expression pour induire l'apparition de formes libres 25 réplicatives, permettant par exemple d'isoler et/ou de purifier le plasmide.

L'utilisation d'un promoteur régulé est particulièrement avantageuse lorsque la cassette est utilisée en cis (sur le vecteur dérivé de pSAM2 lui-même), par exemple dans un procédé industriel de fermentation. Dans ce cas, toute la phase de prolifération et de croissance des cellules est effectuée sans expression du gène de l'invention, c'est- 30 à-dire avec une seule copie du plasmide par chromosome, et, pour la phase de production (d'un produit recombinant, d'un gène de biosynthèse ou de régulation de la synthèse d'un métabolite, etc), le promoteur régulé est induit, entraînant l'apparition de plusieurs copies libres du plasmide et ainsi une activité de production accrue. Ce mode

de mise en oeuvre est particulièrement avantageux lorsque le vecteur dérivé de pSAM2 porte des séquences hétérologues dont la présence en plusieurs nombre de copies peut être toxique aux cellules et/ou affecter leur croissance.

5 Parmi les promoteurs constitutifs utilisables dans le cadre de la présente invention, on peut citer plus particulièrement tout promoteur constitutif fonctionnel dans les Actinomycètes, tel que par exemple le promoteur du gène ermE ou un variant de celui-ci (Bibb et al., Gene 41 (1986) E357), le promoteur p14 du phage I19 de S.ghanaensis (Labes et al., Sixth DFGWT/AFAST, 27-30/11/92), ou tout fragment contenant une région promotrice d'un opéron ribosomique de S.ambofaciens (Pernodet 10 et al., Gene 79 (1989) 33).

Parmi les promoteurs régulables utilisables dans le cadre de la présente invention, on peut citer plus particulièrement tout promoteur régulable fonctionnel dans les Actinomycètes. Il peut s'agir de promoteurs induits spécifiquement par un agent introduit dans le milieu de culture, tel que par exemple le promoteur tipA 15 inducible par le thiostrepton (Murakami et al., J. Bactt. 171 (1989) 1459) ou des promoteurs thermoinductibles comme celui des gènes groEL par exemple (Mazodier et al., J. Bact. 173 (1991) 7382). Il peut également s'agir d'un promoteur d'actinomycètes spécifiquement actif dans les phases tardives du cycle de prolifération des actinomycètes, tel que par exemple certains promoteurs de gènes du métabolisme 20 secondaire (gènes de production d'antibiotiques notamment).

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation des séquences de l'invention telles que définies ci-dessus, ou des cassettes les contenant, pour induire l'apparition de copies libres de vecteurs dérivés de pSAM2 intégrés dans un Actinomycète.

25 Comme indiqué plus haut, cette utilisation peut être effectuée en cis (le gène ou la cassette étant portés par le vecteur intégratif dérivé de pSAM2) ou en trans (le gène ou la cassette étant sur un autre vecteur ou même introduits directement tels quels).

Les vecteurs intégratifs dérivés de pSAM2 tels que mentionnés ci-dessus sont 30 des vecteurs comprenant au moins les éléments de pSAM2 nécessaires à l'intégration, à l'excision et à la réPLICATION. Plus particulièrement, ces vecteurs comprennent donc au moins les régions attP et int telles que décrites dans la demande EP 350 341, le gène

Xis, le gène repSA et l'origine de réPLICATION (ori). Ces différentes régions, sont représentées sur la carte du plasmide pSAM2 donnée sur la figure 1, qui mentionne également certains sites de restriction permettant d'extraire ces régions.

Avantageusement, les vecteurs intégratifs dérivés de pSAM2 comprennent également une séquence d'ADN recombinante codant pour un produit recherché. Il peut s'agir d'un peptide, polypeptide ou protéine présentant un intérêt pharmaceutique ou agroalimentaire. Dans ce cas, le système de l'invention permet d'augmenter le nombre de copies de cette séquence par cellule et donc d'augmenter les niveaux de production de ce produit et ainsi d'augmenter les rendements du procédé de préparation. Le produit recherché peut également être un peptide, polypeptide ou protéine intervenant dans la biosynthèse (synthèse, dégradation, transport ou régulation) d'un métabolite par la souche d'Actinomycète concernée. Dans ce cas, le système de l'invention permet d'augmenter le nombre de copies de cette séquence par cellule et donc d'augmenter les niveaux de production de ce produit et ainsi soit d'augmenter les niveaux de production du métabolite, soit de bloquer la biosynthèse du métabolite, soit de produire des dérivés du métabolite.

Les séquences de l'invention peuvent ainsi être utilisées dans tout Actinomycète dans le génome duquel les vecteurs pSAM2 ou ses dérivés sont capables de s'intégrer. En particulier, elles peuvent être utilisées dans des procédés de fermentation impliquant des souches de Streptomyces, de mycobactéries, de bacillus, etc. A titre d'exemple, on peut citer les souches de S. pristinaespiralis (ATCC 25486), S. antibioticus (DSM 40868), S. bikiniensis (ATCC 11062), S. parvulus (ATCC 12434), S. glaucescens (ETH 22794), S. actuosus (ATCC25421), S. coelicolor (A3(2)), S. ambofaciens, S. lividans, S. griseofuscus, S. limosus, etc (Voir également Smokvina et al., Applications of the integrated plasmid pSAM2, GIM90, Proceedings, Vol. 1, p.403-407).

Des vecteurs dérivés de pSAM2 comportant les éléments décrits ci-dessus peuvent être construits par l'homme du métier, sur la base de ses connaissances générales et des enseignements de la présente demande (Cf également les techniques générales de biologie moléculaire).

Les séquences de l'invention sont tout particulièrement adaptées à une utilisation dans un procédé industriel de production d'antibiotiques (spiramycine,

streptogramines,  $\beta$  lactames, etc dont les gènes sont décrits dans les demandes EP 346 000 et PCT/FR93/00923 notamment).

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

5    **Légende des figures :**

Figure 1 : Carte de restriction du plasmide pSAM2

Figure 2 : Carte de restriction du vecteur pOS531

Figure 3 : Carte de restriction du vecteur pOS532

Figure 4 : Carte de restriction du vecteur pOS541

10    Figure 5 : Carte de restriction du vecteur pOS544

Figure 6 : Carte de restriction du vecteur pOS666. Ce vecteur est construit à partir du plasmide pPM927 (Smokvina et al. gene 94 (1990) 53) par insertion du gène rmf (également désigné pra) et de l'origine de réPLICATION de pSAM2 : tsr : gène de résistance au thiostrepton; stm/spc : gène de résistance à la streptomycine/spectinomycine; oriR : origine de réPLICATION E. coli; oripSAM2 : origine de réPLICATION de pSAM2; ter : terminateur de transcription.

15    Figure 7 : Activité des vecteurs.

**Techniques générales de biologie moléculaire**

20    Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césum, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans Escherichia coli, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

25    Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

5 Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est  
10 effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagénèse dirigée *in vitro* par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

15 L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

20 La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

### Exemples

#### Exemple 1 : Clonage et séquençage de la séquence SEQ ID n° 1

La forme libre de pSAM2 (B2) n'est pas observée dans *S. lividans* TK24  
25 (Hopwood et al., J. Gen. Microbiol. 129 (1983) 2257), seule la forme intégrée est observée. Avec pSAM2 (B3) la forme libre du plasmide coexiste avec la forme intégrée. Des plasmides hybrides ont été construits à partir de pSAM2 (B3) dans lesquels différentes régions ont été remplacées par les régions équivalentes provenant de pSAM2 (B2). Ceci a permis de montrer que la mutation permettant à pSAM2 (B3)  
30 d'exister sous forme libre était localisée dans un fragment de restriction KpnI de 2 kb. La séquence de ce fragment KpnI a été déterminée pour pSAM2 (B2) et pSAM2 (B3). Un seul nucléotide diffère entre ces deux séquences : une paire G/C dans pSAM2 (B2) est remplacée par une paire A/T dans pAM2 (B3). L'analyse de la séquence a montré

que cette mutation se trouvait en amont d'une phase ouverte de lecture qui se prolongeait plus loin que le site KpnI. La séquence de cette phase ouverte de lecture a été déterminée, elle est présentée sur la séquence SEQ ID n°1. Cette phase ouverte de lecture, désignée rmf (ou pra), est située entre les gènes korSA et traSA. La mutation fait disparaître un site de reconnaissance pour l'enzyme de restriction ApaLI (site de reconnaissance : 5'GTGCAC 3'). Ce site est présent chez pSAM2 (B2) mais absent chez pSAM2 (B3).

La séquence SEQ ID n°1 comprend également 100 pb en amont de la région codante, comprenant une partie du promoteur (résidus 1 à 101) et la région 5' non codant mais transcrrite (résidus 102 à 154), portant notamment le site de liaison des ribosomes (RBS).

Dans le mutant pSAM2 (B4), pour lequel la forme libre peut être observée, le site ApaLI est encore présent, indiquant que la mutation n'est pas localisée au même endroit que dans pSAM2 (B3). La séquence de pSAM2 (B4) pour la région correspondante a montré que les séquences de pSAM2 (B2) et de pSAM2 (B4) différaient par un nucléotide. Cette mutation était localisée 8 nucléotides en amont de la mutation détectée dans pSAM2 (B3). Ainsi, dans deux cas indépendants, la présence de la forme libre de pSAM2 (B3) et pSAM2 (B4), qui coexiste avec la forme intégrée, est due à une mutation ponctuelle en amont d'un gène de pSAM2. Ces deux mutations indépendantes sont toutes deux situées dans une région dont les expériences d'analyses des ARN messagers ont montré qu'elle constituait le promoteur de ce gène.

Exemple 2 : Construction de cassettes et vecteurs d'expression de la séquence SEQ ID n° 1

Plusieurs constructions ont été réalisées en utilisant les promoteurs et plasmides suivants :

- Promoteur ermE modifié (ermE\*). Le promoteur ermE modifié utilisé correspond au promoteur décrit par Bibb et al précitée possédant une délétion de 3 nucléotides (bases 252-254, figure 2 de Bibb et al. précitée). Ce promoteur modifié donne une expression forte et constitutive. Il a été isolé sous forme d'un fragment KpnI-BamHI de 275 pb.

- Promoteur tipA : Ce promoteur (Murakami et al. précitée) est présent dans le plasmide pPM927 (Smokvina et al., Gene 94 (1990) 53). Il est induit spécifiquement en présence de thiostrepton.
- Plasmides pIJ486 et pIJ487. Ces deux plasmides ont été décrits par Ward et al. (Mol. Gen. Genet. 203 (1986) 468). Ces plasmides seuls n'ont pas d'influence sur le statut (libre ou intégré) de pSAM2.

### 2.1. Construction du vecteur pOS531

Le vecteur pOS531 a été construit par clonage de la partie codante du gène rmf (résidus 155 à 505 de la séquence SEQ ID n° 1) aux sites BamHI-HindIII du plasmide pIJ487. Ce vecteur porte donc le gène rmf nu (sans signal d'expression ni région 5' non codante). Une carte de ce vecteur est donnée sur la figure 2.

### 2.2. Construction du vecteur pOS532

Le vecteur pOS532 a été construit par clonage du fragment de 275 pb portant le promoteur ermE modifié aux sites EcoRI-BamHI du vecteur pOS531. Ce vecteur porte donc le gène rmf nu sous contrôle du promoteur ermE modifié (figure 3).

### 2.3. Construction du vecteur pOS541

Le vecteur pOS541 a été construit en 2 étapes :

- clonage d'un fragment comportant la partie codante du gène rmf et la région 5' non codante (résidus 102 à 505 de la séquence SEQ ID n° 1) aux sites BamHI-HindIII du plasmide pIJ487,
- addition du fragment de 275 pb portant le promoteur ermE modifié aux sites EcoRI-BamHI du vecteur obtenu ci-dessus.

Ce vecteur porte donc le gène rmf pourvu de sa région 5' non codante, sous contrôle du promoteur ermE modifié (figure 4).

### 2.4. Construction du vecteur pOS544

Le vecteur pOS544 porte un gène rmf déléte dans sa partie 3' (les résidus 102 à 276 de la séquence SEQ ID n° 1 sont présents). Il a été construit par clonage de cette région sous forme d'un fragment BamHI-BspHI (extrémité BspHI traitée par le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'E. coli) dans les sites BamHI HindIII du

plasmide pIJ487 (extrémité HindIII traitée par le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'E. coli). Le vecteur pOS544 porte donc la partie 5' du gène rmf (région 5' non codante + région 5' codante), mais dépourvue de son promoteur. Une carte de ce vecteur est donnée sur la figure 5.

5    Exemple 3 : Apparition de formes libres réplicatives de vecteurs intégratifs dérivés de pSAM2 due au produit d'expression du gène rmf

Cet exemple montre que la surexpression du gène SEQ ID n° 1 peut provoquer l'apparition sous forme libre d'une copie intégrée de pSAM2.

10    3.1. Une preuve directe du rôle d'activateur de la réPLICATION que joue rmf peut être obtenue en provoquant, par expression de rmf, l'apparition sous forme libre d'une copie intégrée de pSAM2 (B2). Le fait que pSAM2 (B2) possède un site ApaLI supplémentaire par rapport à pSAM2 (B3) permet de vérifier simplement par observation du profil de digestion ApaLI que le plasmide libre est bien pSAM2 (B2).

15    3.2. L'activité de la séquence SEQ ID n° 1 a également été mise en évidence par transformation de S.lividans portant une copie intégrée de pSAM2(B2) avec les différents vecteurs décrits ci-dessus, puis recherche de formes libres. Pour cela, S. lividans contenant le plasmide pSAM2(B2) a été transformé par la technique des protoplastes par les différents vecteurs décrits dans l'exemple 2. L'ADN plasmidique ou l'ADN cellulaire total sont extraits à partir d'une culture en phase stationnaire des 20 clones transformés. L'ADN plasmidique est digéré par l'enzyme ApaLI et les fragments de digestion séparés par électrophorèse en gel d'agarose. L'observation du profil de restriction permet de savoir si des copies libres de pSAM2(B2) sont présentes. Ces résultats sont ensuite confirmés par des expériences d'hybridation de l'ADN total avec une sonde pSAM2.

25    Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 7.

Ces résultats montrent que pOS541, qui comporte le promoteur ermE modifié, la région non traduite en amont de rmf avec le site de fixation des ribosomes et la phase codant rmf, provoque l'apparition de formes libres réplicatives de pSAM2(B2). Comme attendu aucun effet n'est observé avec un vecteur ne comportant 30 que la partie codante rmf (pOS531) ou avec un vecteur comportant ermE modifié et la partie codante de rmf, mais aucune région de fixation des ribosomes (pOS532). Aucun

effet n'est observé avec un vecteur portant une délétion dans la partie 3' de rmf (pOS544).

Le même type d'effet est obtenu quand la cassette permettant l'expression inductible de rmf est localisée sur le plasmide pour lequel on souhaite provoquer 5 l'apparition de formes libres (vecteur pOS666, figure 6).

L'ensemble de ces résultats démontre bien que la séquence de l'invention est capable d'induire, en cis ou en trans, l'apparition de formes libres de vecteurs dérivés de pSAM2.

## LISTE DE SEQUENCES

## 5 (1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:  
(A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.  
(B) RUE: 20, avenue R. ARON  
(C) VILLE: ANTONY  
10 (E) PAYS: FRANCE  
(F) CODE POSTAL: 920165

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Séquences d'acides nucléiques  
régulatrices et utilisations.

15 (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 1

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Tape  
20 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible  
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS  
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

25 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 812 paires de bases  
(B) TYPE: acide nucléique  
30 (C) NOMBRE DE BRINS: double  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

35 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

40 (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: CDS  
(B) EMPLACEMENT: 155..505  
(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "gene rmf"

45 (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: -35\_signal  
(B) EMPLACEMENT: 65..70

50 (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: -10\_signal  
(B) EMPLACEMENT: 89..94

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: promoter  
(B) EMPLACEMENT: 1..101

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: RBS  
(B) EMPLACEMENT: 140..145

60 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

	CCAGCAGCCG ACTGACGACC GCTCAACTCC TCACAGCCCC TCGCGAGTTC TCTGTCGCGG	60
	CGGGTTGACT CATGTATAGG AGTGGTGAC C TCTCTTCAT GTCACTCATA TACATGAGTG	120
5	ACGGAGTCCA GCCTCTATAG AGGAGTGATC CGCT GTG CGT CAG ATC CCC GTC Met Arg Gln Ile Pro Val	172
	1 5	
10	GAC ACC TCC GCC GCA ACC GTG ATG GTC GCC AAG ACT CCG GAG CCG AAG Asp Thr Ser Ala Ala Thr Val Met Val Ala Lys Thr Pro Glu Pro Lys	220
	10 15 20	
15	GTG AAG GAC CGC CGG ACC GGT GAG CTG GCC GTC GAC GCC GAG ACC GGT Val Lys Asp Arg Arg Thr Gly Glu Leu Ala Val Asp Ala Glu Thr Gly	268
	25 30 35	
20	GCC AAG CTC ATG ACC GTG AAC GTG ATG TTC GCG GCC AAC GAC GAA GTC Ala Lys Leu Met Thr Val Asn Val Met Phe Ala Ala Asn Asp Glu Val	316
	40 45 50	
25	GAG ATT CTG TCC GTG ACC GTC CCG GAG ACC GGT ATC TCC GGT GAA CTG Glu Ile Leu Ser Val Thr Val Pro Glu Thr Gly Ile Ser Gly Glu Leu	364
	55 60 65 70	
30	GCC ATG GGT ACC CCG GTC GCG CTG ACG GGG CTC ATC GCC CCG CCG TGG Ala Met Gly Thr Pro Val Ala Leu Thr Gly Leu Ile Ala Arg Pro Trp	412
	75 80 85	
35	GAG AAC GAG TTC AAC GGC CAG AAG CGG CAC GGC ATC GCG TTC CGC GCG Glu Asn Glu Phe Asn Gly Gln Lys Arg His Gly Ile Ala Phe Arg Ala	460
	90 95 100	
40	GTC GCG GTC ACG TCG CTG ACC GCT GCG GGC TCG AAG GCT GCC TGATCATGAC Val Ala Val Thr Ser Leu Thr Ala Ala Gly Ser Lys Ala Ala	512
	105 110 115	
45	GTGGTTCATG GTCGCTGTGG TTGTGGTCGT CGCTGCTGCG GGTCTCCTGC GGTGGCGCG CCCCGCCTGG TACTGGCTCA CCTTCGGGGC CCTGGTCGCG ACGGTGCGGG TCCTGGTCCG TACGCCTCGG TCATGGAAGC GTGCGGGCTG ACGGTCCGCC CTCACGCTGG CGGCTGCTCT GGCCCGGATG GCGAATGCCG CGCCTGAGTC CGGGCCGCCG CGCATCTTGC GGTTACGTCC CACTCGTACC GGCCTGGTCT GCGGCTCAAG CTCCGGCCGG GACAGGATGC CTTCGACGTG	572 632 692 752 812

REVENDICATIONS

1. Séquence d'acides nucléiques comprenant tout ou partie de la séquence SEQ ID n° 1 ou d'un variant de celle-ci.
2. Cassette d'expression comprenant une séquence selon la revendication 1  
5 sous contrôle d'un promoteur constitutif ou régulé.
3. Cassette d'expression selon la revendication 2 caractérisée en ce que le promoteur constitutif est choisi parmi le promoteur du gène ermE ou un variant de celui-ci, le promoteur p14 du phage I19 de S.ghanaensis, ou tout fragment contenant une région promotrice d'un opéron ribosomique de S.ambofaciens.
- 10 4. Cassette d'expression selon la revendication 2 caractérisée en ce que le promoteur régulé est choisi parmi les promoteurs induits spécifiquement par un agent introduit dans le milieu de culture, tel que par exemple le promoteur tipA inductible par le thiostrepton ou des promoteurs thermoinductibles comme celui des gènes groEL.
- 15 5. Cassette d'expression selon la revendication 2 caractérisée en ce que le promoteur régulé est choisi parmi les promoteurs d'actinomycètes spécifiquement actifs dans les phases tardives du cycle de prolifération des actinomycètes, tel que par exemple les promoteurs de gènes du métabolisme secondaire (gènes de production d'antibiotiques notamment).
- 20 6. Utilisation d'une séquence ou cassette selon l'une des revendications précédentes pour induire l'apparition de copies libres de vecteurs dérivés de pSAM2 intégrés dans un actinomycète.
7. Utilisation selon la revendication 6 caractérisée en ce que la séquence ou la cassette sont portées par le vecteur intégratif dérivé de pSAM2.
- 25 8. Utilisation selon la revendication 6 caractérisée en ce que la séquence ou la cassette sont portées par un autre vecteur ou introduites directement telles quelles.
9. Utilisation selon les revendications 6 à 8 caractérisée en ce que l'Actinomycète est choisi parmi les Streptomyces, les mycobactéries et bacillus.

**10. Utilisation selon les revendications 6 à 9 dans un procédé industriel de production d'antibiotiques.**

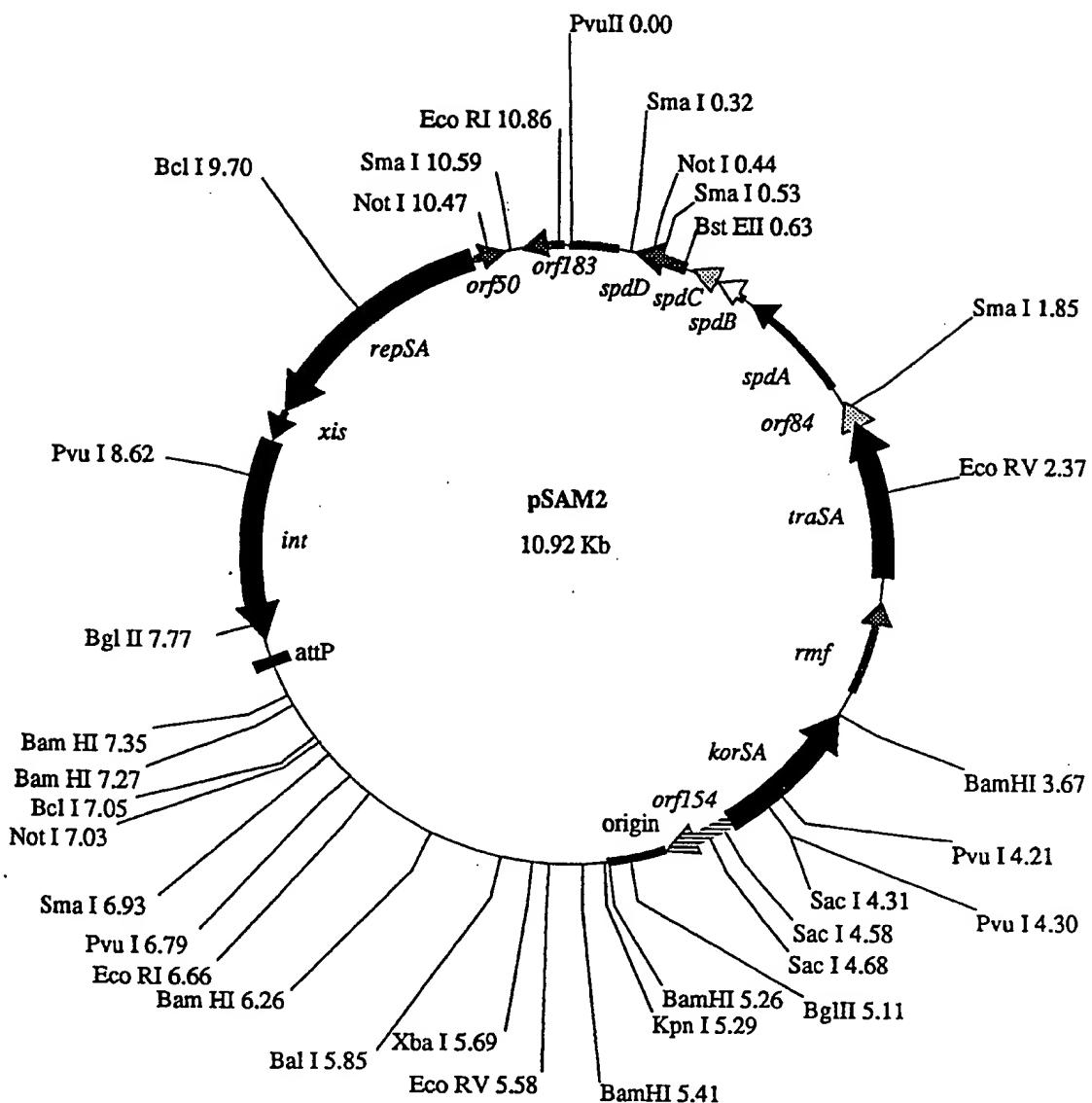


FIGURE 1

2/7

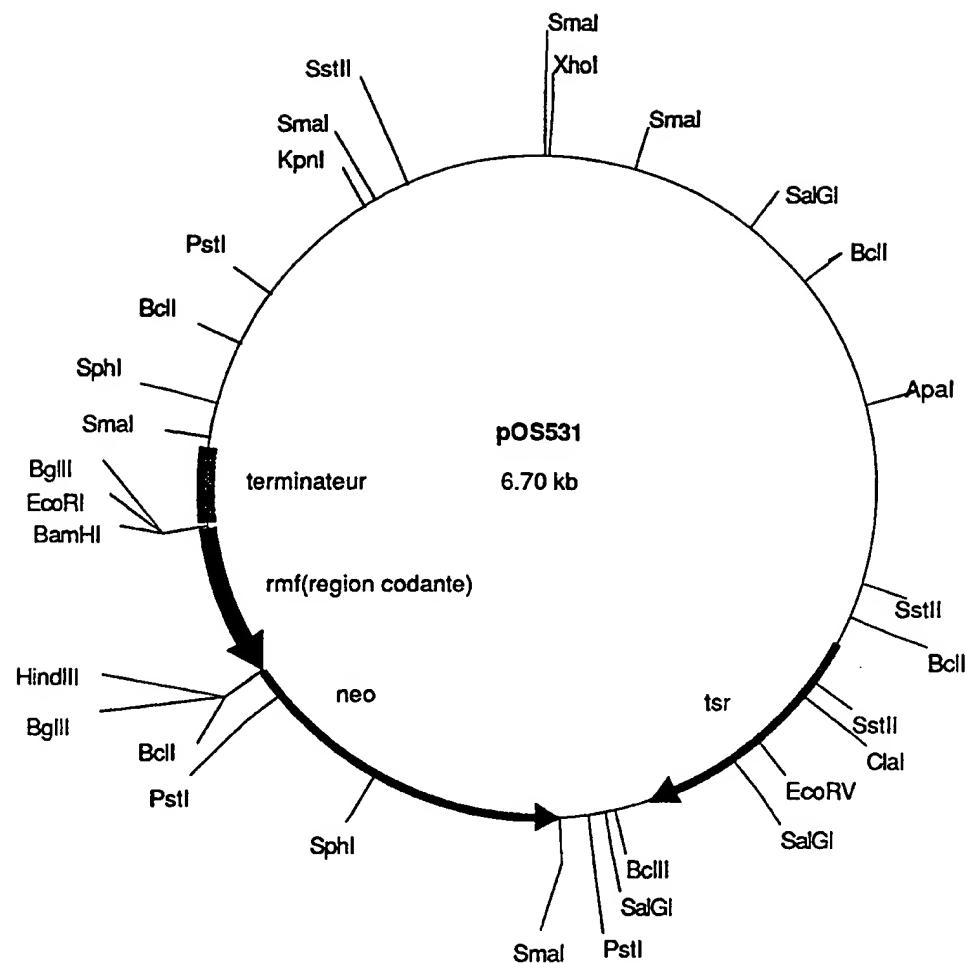


FIGURE 2

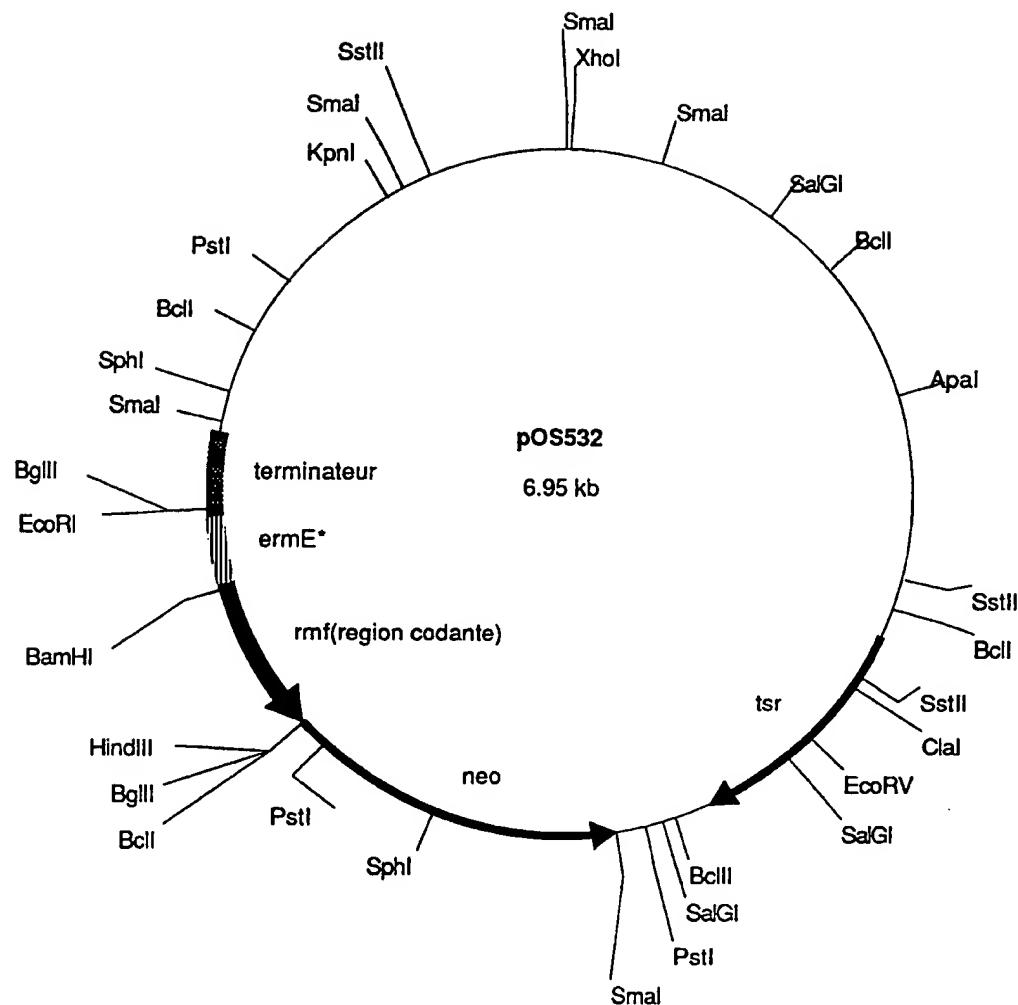


FIGURE 3

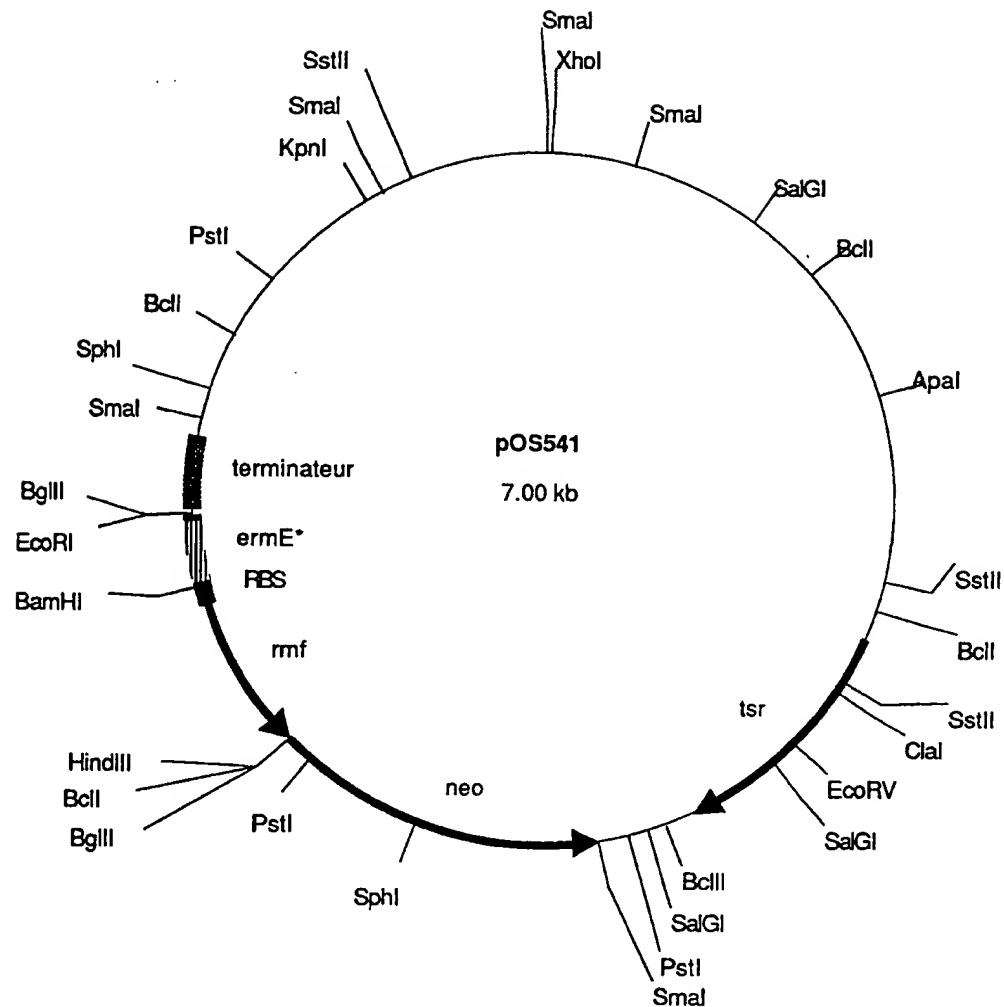


FIGURE 4

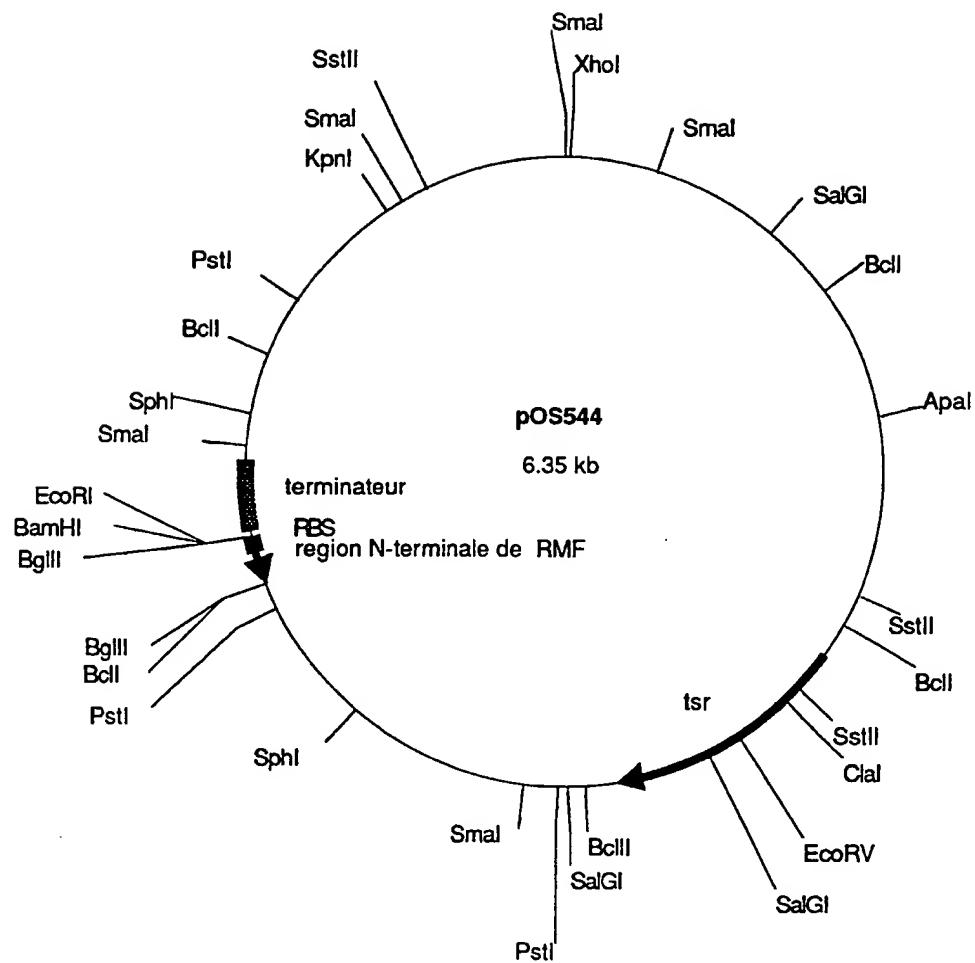


FIGURE 5

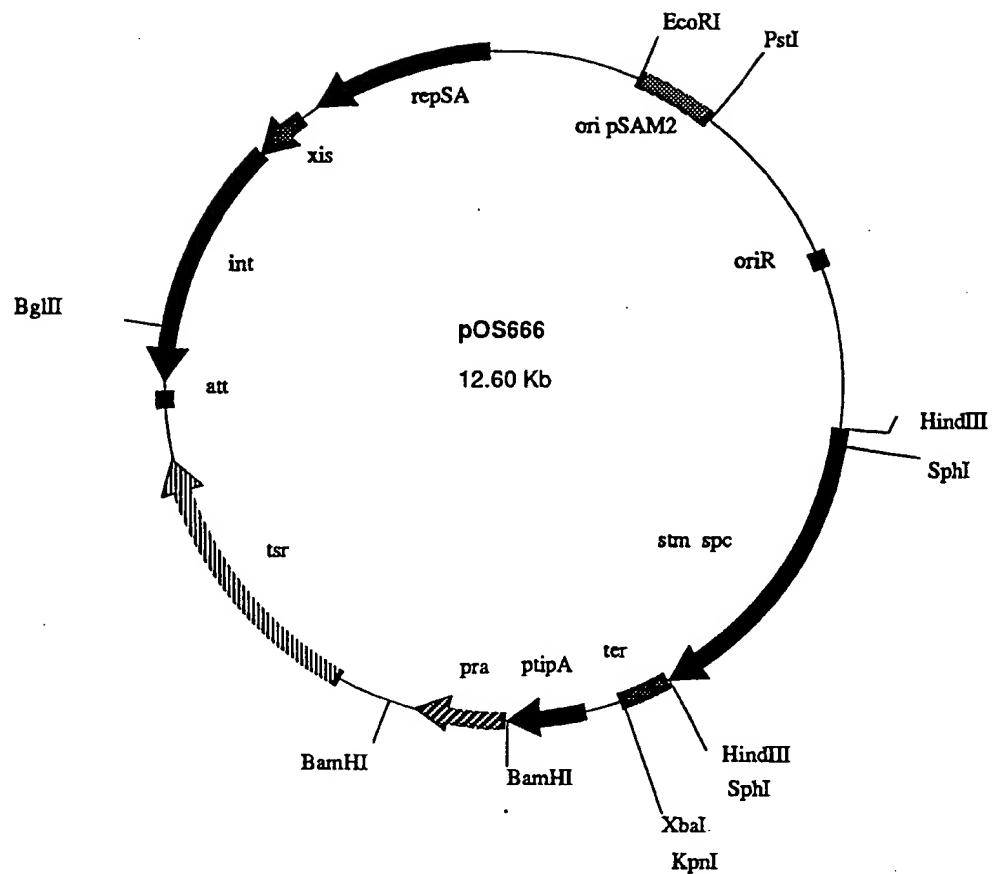


FIGURE 6

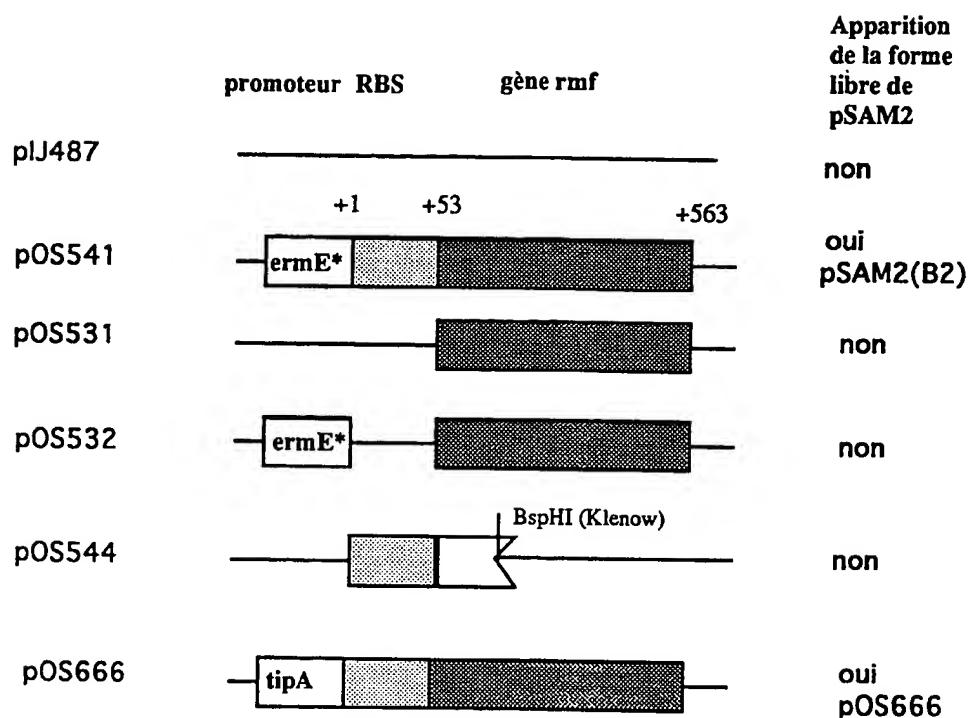


FIGURE 7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No  
PCT/FR 94/01413

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 C12N15/76

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PLASMID, vol.25, no.1, January 1991 pages 40 - 52 T. SMOKVINA ET AL 'Functional analysis of the Streptomyces ambofaciens element pSAM2' see page 41, left column, line 16 - line 22 see page 49, right column, line 10 - line 48 see figure 6 see page 45; figure 3 ----	1
A	see page 41, left column, line 16 - line 22 see page 49, right column, line 10 - line 48 see figure 6 see page 45; figure 3 ----	6

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

'&' document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

20 April 1995

Date of mailing of the international search report

08.05.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Cornec, N

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 94/01413

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, vol.198, no.1, 1984 pages 35 - 41 J.L. PERNODET ET AL 'Plasmids in different strains of Streptomyces ambofaciens : Free and integrated form of plasmid pSAM2' cited in the application see figure 2 see page 40, right column, line 20 - line 31 ---	1
X	EP,A,0 350 341 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ( CNRS)) 10 January 1990 cited in the application see figure 1 ---	1
A	JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol.175, no.17, September 1993 pages 5529 - 5538 J. HAGÈGE ET AL 'Transfer functions of the conjugative integrating element pSAM2 from Streptomyces ambofaciens : Characterization of a kil-kor system associated with transfer' * voir le document en entier plus particulièrement page 5537 colonne de gauche lignes 42 à 45 et figure 1 * ---	1
P,X	PLASMID, vol.31, no.2, February 1994 pages 166 - 183 J. HAGÈGE ET AL 'Identification of a gene encoding the replication initiator protein of the Streptomyces integrating element , pSAM2' see figure 1 see page 169, right column, paragraph 1 -----	1
1		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

Internal Application No

PCT/FR 94/01413

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0350341	10-01-90	FR-A-	2631634	24-11-89

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 94/01413

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N15/76

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	PLASMID, vol.25, no.1, Janvier 1991 pages 40 - 52 T. SMOKVINA ET AL 'Functional analysis of the Streptomyces ambofaciens element pSAM2' voir page 41, colonne de gauche, ligne 16 - ligne 22 voir page 49, colonne de droite, ligne 10 - ligne 48 voir figure 6 voir page 45; figure 3 ----	1
A	voir page 41, colonne de gauche, ligne 16 - ligne 22 voir page 49, colonne de droite, ligne 10 - ligne 48 voir figure 6 voir page 45; figure 3 ----	6

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

1 Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

20 Avril 1995

08.05.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Europeen des Brevets, P.B. 5818 Patentiaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Le Cor nec, N

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 94/01413

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications vistées
X	MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, vol.198, no.1, 1984 pages 35 - 41 J.L. PERNODET ET AL 'Plasmids in different strains of Streptomyces ambofaciens : Free and integrated form of plasmid pSAM2' cité dans la demande voir figure 2 voir page 40, colonne de droite, ligne 20 - ligne 31 ---	1
X	EP,A,0 350 341 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ( CNRS)) 10 Janvier 1990 cité dans la demande voir figure 1 ---	1
A	JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol.175, no.17, Septembre 1993 pages 5529 - 5538 J. HAGÈGE ET AL 'Transfer functions of the conjugative integrating element pSAM2 from Streptomyces ambofaciens : Characterization of a kil-kor system associated with transfer' * voir le document en entier plus particulièrement page 5537 colonne de gauche lignes 42 à 45 et figure 1 * ---	1
P,X	PLASMID, vol.31, no.2, Février 1994 pages 166 - 183 J. HAGÈGE ET AL 'Identification of a gene encoding the replication initiator protein of the Streptomyces integrating element , pSAM2' voir figure 1 voir page 169, colonne de droite, alinéa 1 -----	1
1		

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demand' internationale No

**PCT/FR 94/01413**

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0350341	10-01-90	FR-A- 2631634 JP-A- 2069185	24-11-89 08-03-90